

Cd 对鲫鱼血清溶菌酶和过氧化物酶的影响

丁磊, 吴萍, 蔡春芳, 宋学宏, 黄鹤忠

(苏州大学农业科技学院, 江苏 苏州 215006)

摘要: 用注射染 Cd 的实验方法, 研究了 Cd 对鲫鱼溶菌酶(LSZ)和过氧化物酶(POD)活性的影响。在试验剂量和时间范围内的结果显示, 镉对鲫鱼 LSZ 和 POD 均有剂量-效应关系、时间-效应关系和 Hormesis 现象。1.25 mg·kg⁻¹ 染 Cd 胁迫时对 LSZ 和 POD 有激活作用; 2.5 和 3.75 mg·kg⁻¹ 染 Cd 胁迫时对 LSZ 和 POD 有抑制作用。LSZ 与 Cd 剂量间的剂量-反应关系拟合为 $y = 0.896 + 0.196x - 0.094x^2$ ($r^2 = 0.8205$), POD 与 Cd 剂量间的剂量-反应关系拟合为 $y = 0.262 + 0.042x - 0.019x^2$ ($r^2 = 0.7898$); 1.25 mg·kg⁻¹ 染 Cd 胁迫时 LSZ 顶点所对应的时间为染 Cd 后 12 h, POD 则为 24 h。Cd 对鲫鱼具有明显的免疫毒性。

关键词: Cd; 鲫鱼; 溶菌酶; 过氧化物酶

中图分类号: X503.225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2004)02-0243-03

Effects of CdCl₂ on Lysozyme and Peroxidase Activities of Carassius Auratus

DING Lei, WU Ping, CAI Chun-fang, SONG Xue-hong, HUANG He-zhong

(College of Agricultural Science and Technology, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract: Effects of CdCl₂ on both Lysozyme (LSZ) and Peroxidase (POD) activities of Carassius Auratus were studied using a toxicology test. The results showed that within a range of exposure dosages and duration, there existed linearity relationship between dosage-response and duration-response in terms of Cd²⁺ on both LSZ and POD. The fish treated with 1.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ Cd²⁺ by injection showed significantly higher LSZ and POD compared with the control group, while with 2.5 and 3.75 mg·kg⁻¹·d⁻¹ Cd²⁺ the both enzyme markedly descend on the 14th day. A correlation for dose-response was found between cadmium dosage and LSZ ($y = 0.896 + 0.196x - 0.094x^2$, $r^2 = 0.8205$), and so was for POD ($y = 0.262 + 0.042x - 0.019x^2$). It was also shown that time-effect curves were characterized by parabola for the treatment by injection of 1.25 mg·kg⁻¹ Cd²⁺ within 14 days with the peak of LSZ appearing at the 12 h and POD at the 24 h, respectively. All the results indicate that Cd²⁺ possessed obviously immuno-toxicity to C. auratus.

Keywords: cadmium; carassius auratus; lysozyme; peroxidase

在 1971 年的国际环境会议上, Cd 被公认是当前环境污染最危险的物质之一, 1972 年 FAO 与 WHO 将 Cd 列为第 3 位优先研究的食品污染物^[1]。来自采矿、冶炼、冶金、电镀和染料等行业的含 Cd 废水, 经水生生物富集可达相当高的浓度, 如甲壳类的富集系数为 1.5×10^2 , 藻类为 4×10^2 , 鱼类为 5×10^3 , 并由此经食物链危害了人类健康^[2,3]。免疫系统作为 Cd 作用的主要靶部位, 已有不少研究报道了 Cd 对哺乳动物的免疫毒性^[4-6]。然而, 尽管 Cd 以较高浓度的形式蓄积于

受污染水环境的鱼体内, 但 Cd 对鱼类的免疫毒性尚不清楚。故本试验以注射染 Cd 后鲫鱼血清溶菌酶(LSZ)和过氧化物酶(POD)活性变化来研究 Cd 对鲫鱼的免疫毒性, 这有助于探索重金属对鱼类免疫系统的损伤机制, 为研究鱼类增强对重金属污染的免疫力打下理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1 龄鲫 (50 ± 10) g 购自苏州黄桥水产养殖场, 经 2% NaCl 消毒后在 1 m × 0.6 m × 0.5 m 水族箱中驯养 2 周。试验时随机分配到各水族箱中, 每箱 20 尾。试验期间日投饲率约 3%, 每日换水排污 1 次, 水温 26

收稿日期: 2003-03-04

基金项目: 江苏省科技发展项目(BS2002016)

作者简介: 丁磊(1965—), 男, 上海市人, 讲师, 从事动物病理生理学研究。E-mail: dinglei4444@hotmail.com

℃ ~ 30 ℃, 溶氧保持在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。

1.2 试验分组及处理

1.2.1 剂量 - 效应关系组

按丁磊等^[7]以 0, 0.1, 0.2 和 0.3LD_{50} 即 Cd 浓度 0, 1.25, 2.5 和 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每隔 4 d 腹腔注射 1 次鲫种, 并于第 14 d 时取鲫血检测 LSZ 和 POD, 每组 10 尾。

1.2.2 时间 - 效应关系组

以 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为工作浓度腹腔注射鲫种, 在染 Cd 后 0, 6, 12, 24, 48, 72 和 96 h 取鲫血检测 LSZ 和 POD, 每次 10 尾。

1.3 LSZ 的测定

按刘树青等^[8]方法并略加改进, 将活化的溶壁微生物接种于培养基内, $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 48 h, 用无菌 PB ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH6.4) 离心洗涤 2 次后稀释至 $A_{570} \approx 0.3$ 。测定时将 3 mL 菌悬液与 0.1 mL 待测血清混合后迅速测其 570 nm 处的 A_1 , $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 取出冰浴以终止反应后测其 570 nm 处的 A_2 。在此规定条件下, $\text{LSZ}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = [(A_1 - A_2)/A_2]/0.1$ 。

1.4 POD 的测定

按徐叔云等^[9] Worthington 法并略加改进, 将 0.006% 的过氧化氢溶液 1.5 mL 与 0.05% 的 4-氨基安替比林溶液 1.4 mL 在 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下混合后加入 0.1 mL 待测血清, 稳定后测 510 nm 处以蒸馏水作参比的 1 min 内光吸收度的增大值 A。在此规定条件下, $\text{POD}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = (A \times 3)/(6.58 \times 0.1)$ 。

1.5 数据分析

用单因素方差分析剂量 - 效应关系组中不同 Cd 浓度间免疫指标平均值的差异, 以及时间 - 效应关系组中相同 Cd 浓度但不同时间的免疫指标平均值的差异, 多重比较用 Duncan's 法, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性判定标准。

2 结果

2.1 剂量 - 效应关系组

14 d 时鲫 LSZ 和 POD 变化见表 1。由结果可知 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 染 Cd 胁迫时对 LSZ 和 POD 有激活作用, 2.5 和 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 染 Cd 胁迫时对 LSZ 和 POD 有抑制作用。LSZ 与 Cd 剂量间的剂量 - 反应关系拟合为 $y = 0.896 + 0.196x - 0.094x^2 (r^2 = 0.8205)$, POD 与 Cd 剂量间的剂量 - 反应关系拟合为 $y = 0.262 + 0.042x - 0.019x^2 (r^2 = 0.7898)$ 。

2.2 时间 - 效应关系组

表 1 剂量 - 效应关系组鲫 LSZ 和 POD 变化

Table 1 Variations of LSZ and POD in the fish *C. auratus* for the dose - response group tested

Cd ²⁺ 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	0	1.25	2.5	3.75
LSZ/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.84 ^b	1.16 ^a	0.63 ^c	0.36 ^d
POD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.25 ^b	0.32 ^a	0.21 ^c	0.16 ^d

注: 同行中上标字母相同表示差异无显著性, 上标字母不相同表示差异有显著性

96 h 内鲫 LSZ 和 POD 变化见表 2。由结果可知 LSZ 顶点所对应的时间为染 Cd 后 12 h, POD 顶点所对应的时间为染 Cd 后 24 h。

表 2 时间 - 效应关系组鲫 LSZ 和 POD 变化

Table 2 Variations of LSZ and POD in the fish *C. auratus* for time - response group tested

时间/h	0	6	12	24	48	72	96
LSZ/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.09 ^{bc}	1.29 ^b	1.68 ^a	1.23 ^b	0.84 ^c	1.09 ^{bc}	1.02 ^{bc}
POD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.16 ^c	0.15 ^c	0.19 ^b	0.24 ^a	0.14 ^c	0.15 ^c	0.16 ^c

注: 同行中上标字母相同表示差异无显著性, 上标字母不相同表示差异有显著性

3 讨论

LSZ 是吞噬细胞杀菌的物质基础, 血清 LSZ 主要来自血液中, 是一种碱性蛋白, 能水解革兰氏阳性菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使之裂解被释放出来, 形成一个水解酶体系, 破坏和消除侵入体内的异物, 从而担负起机体防御的功能^[8]。本试验中, Cd 对鲫 LSZ 有时间 - 效应关系、剂量 - 效应关系以及 Hormesis 现象。Hormesis 现象是潜在低水平有毒物质所产生的刺激效应, 所引起的剂量 - 反应关系呈抛物线形式^[10], 表明低剂量 Cd 能刺激鲫的免疫力, 使其产生代偿性应激, 在一定剂量下达到刺激效应顶峰, 高剂量 Cd 则将超出鲫的生理调节范围, 导致免疫力低于对照组, 从而产生免疫毒性。

POD 能减少自由基对正常细胞的损伤, 对细胞生理代谢过程中产生的活性氧具有清除作用, 从而提高机体的解毒功能和防病抗病能力^[8]。本试验中, Cd 对鲫 POD 有时间 - 效应关系、剂量 - 效应关系以及 Hormesis 现象。低浓度镉胁迫对 POD 的激活作用可认为是鲫对 Cd 污染的适应性反应, 以增强机体的免疫力。高浓度 Cd 胁迫对 POD 的抑制作用可认为是 Cd 污染对鲫的作用已超过机体的适应能力, 其所导致的免疫力的降低可以认为是中毒反应的前兆。

Cd 对鲫免疫毒性的机制是 Cd 与谷胱甘肽过氧

化物酶中的硒形成 Cd-Se 复合物, 导致细胞内自由基累积而使酶分子、DNA 分子以及膜脂质过氧化, 造成细胞损伤^[4]。Cd 还能引起淋巴细胞内 Ca^{2+} 浓度异常增加和钙调素浓度异常降低。由于钙和钙调素共同协调细胞内各种依赖于钙的过程, 所以淋巴细胞活化过程受到干扰^[5]。Cd 也能刺激并使淋巴细胞膜上的 β -肾上腺受体密度增加, 从而使细胞内 cAMP 水平改变, 导致免疫抑制^[6]。此外, Cd 能与含羧基、氨基特别是含巯基的蛋白质分子结合, 如与组织蛋白羧基形成不溶性金属蛋白盐, 与巯基形成稳定的金属硫醇盐, 导致许多酶系统的活性受到抑制和破坏, 丧失酶系正常生理功能^[11]。

由于 Cd 浓度直到 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 才对 LSZ 和 POD 产生抑制作用, 因此鲫免疫系统对 Cd 的适应性较强, 这可能与金属硫蛋白(MT)有关。MT 是机体因 Cd 而自发产生的保护措施^[12], Cd 对 MT 的诱导较其它金属离子强^[13, 14], MT 不仅具有解除重金属中毒、调节金属离子代谢、抑制细胞内钙超载和稳定细胞膜等多种细胞保护功能, 还可清除由黄嘌呤氧化酶催化生成的氧自由基, 抑制脂质过氧化, 是目前已知体内最强的羟自由基清除剂^[15, 16], 此外, MT 还能特异性结合到巨噬细胞膜上, 引起巨噬细胞呼吸爆发和信号传递, 导致巨噬细胞释放活化产物以杀灭细菌或寄生蠕虫^[17]。实验动物经静脉注射分别给予 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} , 结果 Cd^{2+} 在 10min 内即从血浆中清除, 并迅速进入肝脏形成 Cd-MT 复合物, 而 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 则在 2 h 后才在血浆中消失, 缓慢地转移到肝脏, 而且 MT 在肝脏中的诱导也表现相似的时相^[18]。

综上所述, Cd 对鲫具有免疫毒性, 但鲫免疫系统对 Cd 的适应性也较强。至于 Cd 对鲫免疫毒性的确切机理尚有待进一步探索。

参考文献:

- [1] 丁伯良. 动物中毒病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 207.
- [2] 蔡清海, 吴善. 福建省海岛生物体的污染物含量及其评价[J]. 热带海洋, 1997, 16(1): 80-88.
- [3] 张晓华, 肖邦定, 陈珠金, 等. 三峡库区香溪河中重金属元素的分布特征[J]. 长江流域资源与环境, 2002, 11(3): 269-273.
- [4] Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Alterations of thiolmetabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions[J]. *Toxicology*, 1998, 126(3): 203-212.
- [5] 张铄, 薛彬, 魏雪涛, 等. 镉免疫毒性机理的初步探讨[J]. 中国环境科学, 1999, 19(6): 530-535.
- [6] 卢次勇, 黎大明, 董书芸, 等. 镉免疫毒性的 β -肾上腺素能受体机制研究[J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34(3): 140-143.
- [7] 丁磊, 蔡春芳, 吴萍, 等. 镉对鲫血红蛋白的影响[J]. 水利渔业, 2002, 22(3): 10-11.
- [8] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278-283.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 547.
- [10] 张铄, 刘毓谷. 毒理学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 216-258.
- [11] 孟紫强. 环境毒理学[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2000. 139.
- [12] Klaassen C D, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39: 267-294.
- [13] Sunderman F W Jr, Plownam M C, Kroftova O S, et al. Effects of teratogenic exposures to Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} on metallothionein and metallothionein-mRNA contents of xenopus embryos[J]. *Pharmacol Toxicol*, 1995, 76(3): 178-184.
- [14] Andrews G K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1): 95-104.
- [15] Ravindra N, Dinender K, Timao Li, et al. Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular[J]. *Toxicology*, 2000, 155: 17-26.
- [16] Vasak M, Hasler D W. Metallothionein: new functional and structural insights[J]. *Cur Opin Chem Bio*, 2000, 4: 177-183.
- [17] Youn J, Borghese L A, Olson E H, et al. Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. II. Effects on macrophage functions[J]. *J Toxicol Environ Health*, 1995, 45: 397-413.
- [18] Suzuki K T, Kawahara S, Sunaga H, et al. Discriminative uptake of metals by the liver and its relation to induction of metallothionein synthesis by interleukin-6, dexamethasone and zinc in the rat[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1996, 18(12): 167-172.